



دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی کرمان

دانشکده پزشکی

پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته انگل شناسی پزشکی

عنوان

بررسی و مقایسه میزان بیان ژن *microRNA 721* (miR-721) در ماکروفاژهای سل لاین
J774 آلوده به سویه های *لیشمانیا تروپیکا* پاسخ دهنده و غیر پاسخ دهنده به داروی
گلوکانتیم

توسط

سید احمد سید آزاد

اساتید راهنما

دکتر زهرا بابائی | دکتر علی افگار

اساتید مشاور

دکتر ایرج شریفی | دکتر تانیا دهش

سال تحصیلی (شهریور ۹۹)

شماره پایان نامه : (۹۹/۳/۵۹۹)



**KERMAN UNIVERSITY
OF MEDICAL SCIENCES**

Faculty of Medicine

In Partial Fulfilment of the Requirement for the MSc of Medical Parasitology

Title

Assessment and comparison of microRNA 721 (miR-721) gene expression level in J774 macrophage cell lines infected with *Leishmania tropica* responsive and non-responsive to Glucantime

By

Seyed Ahmad Seyed Azad

Supervisors

1- Dr. Zahra Bababei | 2- Dr. Ali Afgar

Advisors

1- Dr. Iraj Sharifi | 2- Dr. Tina Dahesh

Thesis No: **(99/3/599)**

Date : **(January, 2020)**

چکیده

مقدمه و اهداف: یکی از چالش‌های مهم در کنترل لیشمانیوز جلدی ایجاد شده توسط لیشمانیا تروپیکا بدلیل انتروپونتیک بودن آن موضوع افزایش موارد مقاومت دارویی این انگل به داروی انتخابی لیشمانیوز یعنی گلوکانتیم است. بنابراین هدف از این مطالعه بررسی miR-721 ماکروفاژهای سل لاین J774 پس از آلودگی با سویه‌های لیشمانیا تروپیکا پاسخ دهنده و غیر پاسخ دهنده به داروی گلوکانتیم و مقایسه تغییرات بیان میکروRNA میزبان توسط انگل‌های مختلف غیر پاسخ دهنده و پاسخ دهنده به دارو است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، پس از کشت انگل لیشمانیا تروپیکا غیر پاسخ دهنده و پاسخ دهنده به گلوکانتیم و تیمار سلول‌های ماکروفاژ رده‌ی سلولی J774 با انگل، در ساعت‌های ۶، ۱۲، ۲۴، و ۷۲، استخراج miRNA صورت گرفت. پس از سنتز cDNA، با استفاده از روش TaqMan real-time PCR، بیان ژن miR-721 مورد بررسی قرار گرفت و از تست ANOVA برای آنالیز آماری نتایج، استفاده گردید.

نتایج: طبق نتایج، در سلول‌های ماکروفاژ تیمار شده با پروماستیگوت لیشمانیا تروپیکا، بیشترین میزان بیان ژن miR-721 در ارتباط با ساعت ۲۴ بعد از تیمار سلول‌های ماکروفاژ با پروماستیگوت‌های انگل پاسخ دهنده به گلوکانتیم بود که افزایش $2424/6$ fold change را از خود نشان دادند و بعد از آن بیشترین بیان مربوط به سلول‌های تیمار شده با انگل مقاوم به دارو در زمان ۲۴ ساعت، با افزایش بیان $1135/2$ بود. همچنین طبق نتایج آنالیز آماری، بیان این ژن بین گروه غیر پاسخ دهنده و پاسخ دهنده به گلوکانتیم تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($p\text{-value} < 0.0001$). همچنین، هر کدام از این گروه‌ها، در مقایسه با گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری را بین بیان ژن miR-721 نشان دادند ($p\text{-value} < 0.0001$).

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که هر دو سویه‌های غیر پاسخ دهنده و پاسخ دهنده به گلوکانتیم لیشمانیا تروپیکا، بیان miR-721 را در سلول‌های میزبان سل لاین ماکروفاژی J774، دستکاری نموده و باعث افزایش بیان آن در سلول میزبان بویژه توسط سویه استرین پاسخ دهنده شود. همچنین نتایج به اهمیت این microRNA در زنده ماندن و استقرار انگل در ماکروفاژ اشاره می‌نماید. به نظر می‌رسد که، miR-721

پتانسیل این را دارد که به عنوان بیومارکری برای تمایز بین حالت های پاتولوژیکی مختلف استفاده شود و برای اهداف ساخت دارو و یا کنترل بیماری مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: لیشمانیوز، لیشمانیا تروپیکا، ماکروفاژ، miR-721، پاسخ دهنده یا غیر پاسخ دهنده، گلوکانتیم

Abstract

Background and aims: One of the most important challenges to control of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* and its anthroponotic nature is the increased drug resistance of this protozoan to glucantime as the selective drug for the treatment of leishmaniasis. The aim of this study was to study miR721 profile in macrophage cell lines J774A.1 treated with *Leishmania tropica* responsive and non-responsive to glucantime and comparing the different changes in miRNA expression in host cells treated with the parasites.

Materials and methods: In this study, following culture of *Leishmania tropica* strains responsive and non-responsive to glucantime and infection of macrophage cell line with the parasites, miRNA extraction was carried out at 6, 12, 24, and 72 h after treatment. Afterward cDNA synthesis, TaqMan real-time PCR and ANOVA test were used to investigate the expression of miR721 and statistical analysis respectively.

Results: The highest expression of miR721 in macrophage cells treated with *Leishmania tropica* promastigotes was at 24h post infection with promastigotes responsive to glucantime, indicating 2424.6 fold changes increase. The second highest expression level detected in treated cells with non-responsive to the drug strains at 24 h post infection with 1135.2 fold changes increase. Moreover, based on statistical analyses, there was a significant difference between the expression of miR721 between non-responsive and responsive groups ($P\text{-value} < 0.0001$). Furthermore, each of these groups showed a statistically significant difference in the expression of miR721 compared to the control group ($P\text{-value} < 0.0001$).

Conclusion: This study showed that both responsive and non-responsive to glucantime *Leishmania tropica* strains could manipulate of miR721 expression in the J774 macrophage host cell line particularly by the responsive ones. Likewise, it pointed to the importance of this microRNA in survival and establishment of the parasite in the cell. It seems, miR721 has the potential to be used as a biomarker for the distinction between different pathological states of the disease and for therapeutic or control strategies.

Keywords: Leishmaniasis, *Leishmania tropica*, macrophage, miR721, Responsive or non-responsive, Glucantime

فهرست مندرجات

عنوان	صفحه
فهرست جداول.....	ط
فهرست نمودارها.....	ي
فهرست اشكال.....	ك
فهرست پيوست ها.....	ل
فهرست کوتاه نوشته ها.....	ی
چکیده.....	

فصل اول: مقدمه و اهداف

۱-۱ مقدمه.....	۲
۱-۲ اهداف.....	۷
۱-۲-۱ هدف كلي طرح.....	۷
۱-۲-۲ اهداف اختصاصي يا ویژه طرح.....	۷
۱-۲-۳ اهداف کاربردي طرح.....	۷
۱-۲-۴ فرضيات يا سؤالات پژوهش (با توجه به اهداف طرح).....	۸

فصل دوم: بررسی متون

۲-۱ کلیات.....	۱۰
۲-۱-۱ تاریخچه لیثمانیا.....	۱۰

۱۱	۲-۱-۲ طبقه بندی انگل لیشمانیا.....
۱۱	۲-۱-۳ چرخه زندگی.....
۱۲	۲-۱-۴ گونه های مختلف بیماری لیشمانیا و روش های تشخیص آن.....
۱۲	۲-۱-۴-۱ لیشمانیوز پوستی (سالک).....
۱۳	۲-۱-۴-۲ لیشمانیوز احشائی (کالاآزار).....
۱۳	۲-۱-۵ درمان های کلاسیک لیشمانیوز.....
۱۵	۲-۱-۶ miRNA ها.....
۱۶	۲-۱-۶-۱ بیوژنز miRNA ها.....
۱۸	۲-۱-۶-۲ miRNA و تکامل سلول های قلبی عروقی.....
۱۹	۲-۱-۶-۳ miRNA و تمایز سلول های بنیادی.....
۱۹	۲-۱-۶-۴ miRNA و سیستم ایمنی.....
۲۰	۲-۱-۶-۵ miRNA و نقش آن ها در دیگر فرآیندهای پاتولوژیکی.....
۲۰	۲-۱-۶-۶ شناسایی مولکول های هدف microRNA.....
۲۱	۲-۱-۶-۷ miRNA ها در انگل.....
۲۲	۲-۱-۶-۸ miRNA های میزبان در پاسخ به عفونت انگلی.....
۲۴	۲-۲ مطالعات پیشین.....

فصل سوم: مواد و روش ها

۳۰	۳-۱ مواد و دستگاه های استفاده شده در این مطالعه.....
----	--

۳۲ ۳-۲ پرایمرها، stem-loop، و پروب های مورد استفاده در این مطالعه
۳۳ ۳-۳ نمونه های مورد مطالعه
۳۴ ۳-۴ کشت انگل لیشمانیا
۳۴ ۳-۵ تیمار سلول های ماکروفاژ با لیشمانیا تروپیکا پاسخ دهنده و غیر پاسخ دهنده به گلوکانتیم
۳۶ ۳-۶ استخراج miRNA
۳۸ ۳-۷ ارزیابی کیفیت miRNA استخراج شده
۳۸ ۳-۸ استخراج cDNA
۴۰ ۳-۹ بررسی بیان miR-721 با استفاده از روش Real Time PCR
۴۲ ۳-۱۰ روش آنالیز آماری
۴۲ ۳-۱۱ ملاحظات اخلاقی

فصل چهارم: نتایج

۴۴ ۴-۱ نتایج خلوص RNA و Real-time PCR
۴۵ ۴-۲ نتایج بیان ژن miR-721
۴۵ ۴-۲-۱ بیان ژن miR-721 در سلول های ماکروفاژ تیمار شده با پروماستیگوت لیشمانیا تروپیکا پاسخ دهنده به داروی گلوکانتیم در فواصل زمانی مختلف
۴۷ ۴-۲-۲ بیان ژن miR-721 در سلول های ماکروفاژ تیمار شده با پروماستیگوت لیشمانیا تروپیکا غیر پاسخ دهنده به داروی گلوکانتیم در فواصل زمانی مختلف
۴۹ ۴-۳ نتایج آنالیز آماری
۵۰ ۴-۳-۱ مقایسه میانگین بیان ژن miR-721، ۶ ساعت پس از تیمار سلول های ماکروفاژ

۴-۳-۲	مقایسه میانگین بیان miR-721 در ساعت ۱۲	۵۰
۴-۳-۳	مقایسه میانگین بیان miR-721 در ساعت ۲۴	۵۱
۴-۳-۴	مقایسه میانگین بیان miR-721 در سلول های ماکروفاژ ۷۲ ساعت پس از تیمار	۵۲
۴-۳-۵	مقایسه میانگین بیان miR-721 در سلول های ماکروفاژ گروه کنترل و گروه های تیمار در ساعات مختلف	۵۳
۴-۳-۶	مقایسه اثر متقابل متغیر های گروه سلولی (تیمار و کنترل) و زمان (ساعات مختلف ۶-۷۲ ساعت) در بیان miR-721	۵۴

فصل پنجم: بحث و نتیجه گیری

بحث و نتیجه گیری	۵۹
۵-۱ بحث	۶۵
۵-۲ نتیجه گیری	۷۴
۵-۳ پیشنهادات	۷۵
منابع	۷۶
پیوست ها	۸۶

فهرست جداول

عنوان	صفحه
جدول ۱-۳ مواد مورد استفاده	۳۰
جدول ۲-۳ دستگاه های مورد استفاده در این مطالعه	۳۲
جدول ۳-۳ توالی های پرایمرها، stem-loop، و پروب اختصاصی مورد استفاده در این مطالعه	۳۳
جدول ۴-۳ مواد و مقادیر لازم جهت ساخت cDNA	۳۹
جدول ۵-۳ برنامه ی دمایی ساخت cDNA	۳۹
جدول ۶-۳ سیکل دمایی واکنش Real Time PCR	۴۱
جدول ۱-۴ میزان بیان miR-721 در سلول های ماکروفاژ رده ی سلولی J774 گروه کنترل و تیمار با لیشمانیا تروپیکا پاسخ دهنده به گلوکانتیم در فواصل زمانی مختلف	۴۵
جدول ۲-۴ میزان بیان miR-721 در سلول های ماکروفاژ رده ی سلولی J774 در گروه کنترل و تیمار با لیشمانیا تروپیکا غیر پاسخ دهنده به گلوکانتیم در فواصل زمانی مختلف	۴۷
جدول ۳-۴ مقایسه توصیفی متوسط بیان miR-721 ماکروفاژ های آلوده به لیشمانیا تروپیکا در گروه های مختلف (کنترل، پاسخ دهنده و غیر پاسخ دهنده به گلوکانتیم) در زمان های مختلف ۶، ۱۲، ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از آلودگی	۵۴
جدول ۴-۴ مقایسه اثر متقابل دو متغیر گروه (پاسخ دهنده، غیر پاسخ دهنده و کنترل) و گروه زمان بر بیان miR-721	۶۰
جدول ۵-۴ مقایسه متوسط بیان miR-721 در ماکروفاژ های آلوده به لیشمانیا تروپیکا در هر گروه (پاسخ دهنده، غیر پاسخ دهنده به گلوکانتیم و کنترل) و در هر زمان و در مقایسه با سایر زمان ها در همین گروه	۶۱

فهرست نمودارها

عنوان

صفحه

- نمودار ۴-۱** میزان بیان miR-721 در سلول های ماکروفاژ رده ی سلولی J774 گروه کنترل و تیمار با لیشمانیا تروپیکا پاسخ دهنده به گلوکانتیم در فواصل زمانی مختلف ۴۶
- نمودار ۴-۲** میزان بیان miR-721 در سلول های ماکروفاژ رده ی سلولی J774 در حالت کنترل و تیمار با لیشمانیا تروپیکا ۴۸
- نمودار ۴-۳** بیان ژن miR-721 در ماکروفاژهای تیمار شده با پروماستیگوت های لیشمانیا تروپیکا پاسخ دهنده و غیر پاسخ دهنده به داروی گلوکانتیم، در زمان های ۶، ۱۲، ۲۴، و ۷۲ ساعت بعد از تیمار، با استفاده از real-time PCR، در مقایسه با ماکروفاژهایی که با انگل تیمار نشده بودند (گروه کنترل) ۴۹
- نمودار ۴-۴** مقایسه ی بیان miR-721 در سلول های ماکروفاژ رده ی سلولی J774 در گروه کنترل و تیمار با پروماستیگوت لیشمانیا تروپیکا ۵۰
- نمودار ۴-۵** مقایسه ی بیان miR-721 در سلول های ماکروفاژ رده ی سلولی J774 در گروه های کنترل و تیمار شده با پروماستیگوت لیشمانیا تروپیکا غیر پاسخ دهنده و پاسخ دهنده به دارو در ساعت ۱۲ ۵۱
- نمودار ۴-۶** مقایسه ی بیان ژن miR-721 در سلول های ماکروفاژ رده ی سلولی J774 در گروه های کنترل و تیمار شده با پروماستیگوت لیشمانیا تروپیکا غیر پاسخ دهنده و پاسخ دهنده به دارو در ساعت ۲۴ ۵۲
- نمودار ۴-۷** مقایسه ی بیان ژن miR-721 در سلول های ماکروفاژ رده ی سلولی J774 در گروه های کنترل و تیمار شده با پروماستیگوت لیشمانیا تروپیکا غیر پاسخ دهنده و پاسخ دهنده به دارو در ساعت ۷۲ ۵۳

فهرست اشکال

عنوان	صفحه
شکل ۱-۲ چرخه لیشمانیا.....	۱۲
شکل ۲-۲ داروهای مورد استفاده برای درمان لیشمانیوز جلدی و احشایی.....	۱۵
شکل ۳-۲ بیوژنز miRNA ها در حیوانات.....	۱۸
شکل ۴-۲ پاسخ miRNA های میزبان به عفونت به کریپتوسپوریدیوم.....	۲۳

فهرست پیوست ها

صفحه

عنوان

پیوست شماره یک: برگه اطلاعات ایمنی مواد ۸۷

1. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS one. 2012;7(5):56-71.
2. Geneva WHO, editor WHO; 2010. Control of the leishmaniasis : report of a meeting of the WHO Expert Committee on the control of leishmaniasis.
3. Bailey F, Mondragon-Shem K, Hotez P, Ruiz-Postigo JA, Al-Salem W, Acosta-Serrano A. A new perspective on cutaneous leishmaniasis—Implications for global prevalence and burden of disease estimates. PLoS neglected tropical diseases. 2017;11(8):73-89.
4. Herwaldt BL. Leishmaniasis. Lancet. 1999;35(4):1191-9.
5. Bouvier J, Etges RJ, Bordier C. Identification and purification of membrane and soluble forms of the major surface protein of *Leishmania* promastigotes. Journal of Biological Chemistry. 1985;260(29):4-9.
6. McConville MJ, De Souza D, Saunders E, Likic VA, Naderer T. Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania* amastigotes. Trends in parasitology. 2007;23(8):368-75.
7. Blackwell JM, Ezekowitz R, Roberts MB, Channon JY, Sim RB, Gordon S. Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. Journal of Experimental Medicine. 1985;162(1):324-31.
8. Van Assche T, Deschacht M, da Luz RAI, Maes L, Cos P. *Leishmania*-macrophage interactions: Insights into the redox biology. Free Radical Biology and Medicine. 2011;51(2):337-51.

9. Mosser DM, Rosenthal LA, editors. *Leishmania*-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. *Seminars in cell biology*; 1993;1(1):12-41.
10. Ribeiro-Gomes FL, Otero AC, Gomes NA, Moniz-de-Souza MCA, Cysne-Finkelstein L, Arnholdt AC. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *The Journal of Immunology*. 2004;172(7):4454-62.
11. Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annual reviews in cell development biology*. 2007;23(1):175-205.
12. Kim VN, Nam J-W. Genomics of microRNA. *Trends in genetics*. 2006;22(3):165-73.
13. Lu M, Zhang Q, Deng M, Miao J, Guo Y, Gao W. An analysis of human microRNA and disease associations. *PloS one*. 2008;3(10):e3420.
14. Lemaire J, Mkannez G, Guerfali FZ, Gustin C, Attia H, Sghaier RM. MicroRNA expression profile in human macrophages in response to *Leishmania major* infection. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013;7(10):24-78.
15. Muxel SM, Laranjeira-Silva MF, Zampieri RA, Floeter-Winter LM. *Leishmania amazonensis* induces macrophage miR-294 and miR-721 expression and modulates infection by targeting NOS2 and L-arginine metabolism. *Scientific reports*. 2017;7(1):4-14.
16. Steverding D. The history of leishmaniasis. *Parasites & vectors*. 2017;10(1):82-95.
17. Cunningham DD. On the presence of peculiar organisms in the tissue culture of a specimen of Delhi boil. *Scientific Memoirs by Medical Officers of the Army of India*. 1885;1(1):21-31.

18. Adler S, Theodor O. The identity of *Leishmania tropica* Wright, 1903, and *Herpetomonas papatasi* Adler, 1925. *Annals of tropical medicine & parasitology*. 1926;20(4):355-64.
19. Quinn SR, O'Neill LA. A trio of microRNAs that control Toll-like receptor signalling. *International immunology*. 2011;23(7):421-5.
20. Bailey H, Bishop W. Leishman-Donovan Bodies and Donovaniasis: Sir William Boog Leishman, 1865-1926: Charles Donovan, 1863-1951. *British journal of venereal diseases*. 1959;35(1):8-28.
21. Sadeq M. Spatial patterns and secular trends in human leishmaniasis incidence in Morocco between 2003 and 2013. *Infectious diseases of poverty*. 2016;5(1):48-60.
22. Adler S. *Leishmania*. *Advances in parasitology*. 2: Elsevier; 1964. p. 35-96.
23. Rudzinska MA, D'Alesandro PA, Trager W. The fine structure of *Leishmania donovani* and the role of the kinetoplast in the *leishmania*-leptomonad transformation. *The Journal of protozoology*. 1964;11(2):166-91.
24. Sacks DL, Perkins PV. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science*. 1984;223(4643):1417-9.
25. Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International journal for parasitology*. 2007;37(10):1097-106.
26. Wheeler RJ, Gluenz E, Gull K. The cell cycle of *Leishmania*: morphogenetic events and their implications for parasite biology. *Molecular microbiology*. 2011;79(3):647-62.
27. Leta S, Dao THT, Mesele F, Alemayehu G. Visceral leishmaniasis in Ethiopia: an evolving disease. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014;8(9):13-31.

28. Reithinger R, Dujardin J-C, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet infectious diseases*. 2007;7(9):581-96.
29. Bailey MS, Lockwood DN. Cutaneous leishmaniasis. *Clinics in dermatology*. 2007;25(2):203-11.
30. Yaghoobi-Ershadi MR, Hanafi-Bojd AA, Javadian E, Jafari R, Zahraei-Ramazani AR, Mohebbali M. A new focus of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica*. *Saudi medical journal*. 2002;23(3):291-4.
31. Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*. 2005;309(5733):436-42.
32. Mohebbali M. Visceral leishmaniasis in Iran : review of the epidemiological and clinical features. *Iranian journal of parasitology*. 2013;8(3):34-48.
33. Yardley V, Khan AA, Martin MB, Slifer TR, Araujo FG, Moreno SN. In vivo activities of farnesyl pyrophosphate synthase inhibitors against *Leishmania donovani* and *Toxoplasma gondii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002;46(3):929-31.
34. Rojas R, Valderrama L, Valderrama M, Varona MX, Ouellette M, Saravia NG. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania (Viannia)* infection. *The Journal of infectious diseases*. 2006;193(10):1375-83.
35. Hadighi R, Mohebbali M, Boucher P, Hajjarian H, Khamesipour A, Ouellette M. Unresponsiveness to Glucantime treatment in Iranian cutaneous leishmaniasis due to drug-resistant *Leishmania tropica* parasites. *PLoS medicine*. 2006;3(5):e162.
36. De Carvalho P, Arribas MdG, Ferreira EI. Leishmaniasis. What do we know about its chemotherapy? *Revista Brasileira de Ciências Farmacéuticas*. 2000;36(1):69-96.

37. Croft SL, Seifert K, Yardley V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *The Indian journal of medical research*. 2006;123(3):399–410.
38. Escobar P, Yardley V, Croft SL. Activities of Hexadecylphosphocholine (Miltefosine), AmBisome, and Sodium Stibogluconate (Pentostam) against *Leishmania donovani* in immunodeficient mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001;45(6):1872–5.
39. Grimson A, Srivastava M, Fahey B, Woodcroft BJ, Chiang HR, King N. Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals. *Nature*. 2008;455(7217):11–93.
40. Xie X, Lu J, Kulbokas E, Golub TR, Mootha V, Lindblad-Toh K. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature*. 2005;434(7031):3–38.
41. Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. The impact of microRNAs on protein output. *Nature*. 2008;455(7209):64–84.
42. Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Abbott AL, Lau NC, Hellman AB, McGonagle SM. Most *Caenorhabditis elegans* microRNAs are individually not essential for development or viability. *PLoS genetics*. 2007;3(12):2–15.
43. Rathjen T, Nicol C, McConkey G, Dalmay T. Analysis of short RNAs in the malaria parasite and its red blood cell host. *FEBS letters*. 2006;580(22):5185–8.
44. Prucca CG, Slavin I, Quiroga R, Elías EV, Rivero FD, Saura A. Antigenic variation in *Giardia lamblia* is regulated by RNA interference. *Nature*. 2008;456(7223):7–15.
45. Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*. 2007;448(7149):8–13.

46. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *cell*. 2004;116(2):281-97.
47. Okamura K, Phillips MD, Tyler DM, Duan H, Chou Y-t, Lai EC. The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. *Nature structural & molecular biology*. 2008;15(4):35-44.
48. Bogerd HP, Karnowski HW, Cai X, Shin J, Pohlers M, Cullen BR. A mammalian herpesvirus uses noncanonical expression and processing mechanisms to generate viral microRNAs. *Molecular cell*. 2010;37(1):135-42.
49. Varble A, Chua MA, Perez JT, Manicassamy B, García-Sastre A. Engineered RNA viral synthesis of microRNAs. *Proceedings of the national academy of sciences*. 2010;107(25):19-24.
50. Kim Y-K, Heo I, Kim VN. Modifications of small RNAs and their associated proteins. *Cell*. 2010;143(5):703-9.
51. A Bravo J, G Dinan T. MicroRNAs: a novel therapeutic target for schizophrenia. *Current pharmaceutical design*. 2011;17(2):176-88.
52. Tomankova T, Petrek M, Kriegova E. Involvement of microRNAs in physiological and pathological processes in the lung. *Respiratory research*. 2010;11(1):159.
53. Devaney E, Winter AD, Britton C. microRNAs: a role in drug resistance in parasitic nematodes? *Trends in parasitology*. 2010;26(9):428-33.
54. Silva MRG, Tosar JP, Frugier M, Pantano S, Bonilla B, Esteban L. Cloning, characterization and subcellular localization of a *Trypanosoma cruzi* argonaute protein defining a new subfamily distinctive of trypanosomatids. *Gene*. 2010;466(1-2):26-35.

55. Braun L, Cannella D, Ortet P, Barakat M, Sautel CF, Kieffer S. A complex small RNA repertoire is generated by a plant/fungal-like machinery and effected by a metazoan-like Argonaute in the single-cell human parasite *Toxoplasma gondii*. PLoS pathogens. 2010;6(5):9-20.
56. Jaubert-Possamai S, Rispe C, Tanguy S, Gordon K, Walsh T, Edwards O. Expansion of the miRNA pathway in the hemipteran insect *Acyrtosiphon pisum*. Molecular biology and evolution. 2010;27(5):979-87.
57. Sathe A, Ayyar K, Reddy K. MicroRNA let-7 in the spotlight: Role in innate immunity. Inflammation and cell signaling. 2014;1(1):12-36.
58. Zhou R, O'hara SP, Chen X-M. MicroRNA regulation of innate immune responses in epithelial cells. Cellular & molecular immunology. 2011;8(5):39-71.
59. Zhou R, Hu G, Gong A-Y, Chen X-M. Binding of NF-kappaB p65 subunit to the promoter elements is involved in LPS-induced transactivation of miRNA genes in human biliary epithelial cells. Nucleic acids research. 2010;38(10):3222-32.
60. Gong A-Y, Zhou R, Hu G, Liu J, Sosnowska D, Drescher KM, et al. *Cryptosporidium parvum* induces B7-H1 expression in cholangiocytes by down-regulating microRNA-513. The Journal of infectious diseases. 2010;201(1):160-9.
61. Zeiner GM, Norman KL, Thomson JM, Hammond SM, Boothroyd JC. *Toxoplasma gondii* infection specifically increases the levels of key host microRNAs. PloS one. 2010;5(1):27-42.

62. Pandey RK, Sundar S, Prajapati VK. Differential expression of miRNA regulates T cell differentiation and plasticity during visceral leishmaniasis infection. *Frontiers in microbiology*. 2016;7(206):13-39.
63. Singh AK, Pandey RK, Shaha C, Madhubala R. MicroRNA expression profiling of *Leishmania donovani*-infected host cells uncovers the regulatory role of miR30A-3p in host autophagy. *Autophagy*. 2016;12(10):1817-31.
64. Frank B, Marcu A, Petersen ALdOA, Weber H, Stigloher C, Mottram JC. Autophagic digestion of *Leishmania major* by host macrophages is associated with differential expression of BNIP3, CTSE, and the miRNAs miR-101c, miR-129, and miR-210. *Parasites & vectors*. 2015;8(1):4-14.
65. Ghosh J, Bose M, Roy S, Bhattacharyya SN. *Leishmania donovani* targets Dicer1 to downregulate miR-122, lower serum cholesterol, and facilitate murine liver infection. *Cell host & microbe*. 2013;13(3):277-88.
66. Tiwari N, Kumar V, Gedda MR, Singh AK, Singh VK, Singh SP. Identification and characterization of miRNAs in response to *Leishmania donovani* infection: delineation of their roles in macrophage dysfunction. *Frontiers in microbiology*. 2017;8(1):3-14.
67. Diotallevi A, De Santi M, Buffi G, Ceccarelli M, Vitale F, Galluzzi L. *Leishmania* infection induces microRNA hsa-miR-346 in human cell line-derived macrophages. *Frontiers in microbiology*. 2018;9(1):10-19.
68. Oliae RT, Sharifi I, Afgar A, Jafarzadeh A, Kareshk AT, Bamorovat M. Differential expression of TLRs 2, 4, 9, iNOS and TNF- α and arginase activity in peripheral blood monocytes

from glucantime unresponsive and responsive patients with anthroponotic cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica*. Microbial pathogenesis. 2019;12(6):368-78.

69. Hashemi N, Sharifi M, Tolouei S, Hashemi M, Hashemi C, Hejazi SH. Expression of hsa Let-7a microRNA of macrophages infected by *Leishmania major*. International journal of medical research & health sciences. 2018;5(10):27-32.

70. Lago TS, Silva JA, Lago EL, Carvalho EM, Zanette DL, Castellucci LCDC. The miRNA 361-3p, a regulator of GZMB and TNF is associated with therapeutic failure and longer time healing of cutaneous leishmaniasis caused by *L.(viannia) braziliensis*. Frontiers in immunology. 2018;9(1):2-21.

71. Hewson C, Capraro D, Burdach J, Whitaker N, Morris KV. Extracellular vesicle associated long non-coding RNAs functionally enhance cell viability. Non-coding RNA research. 2016;1(1):3-11.

72. Chakraborty C, Sharma AR, Sharma G, Doss CGP, Lee S-S. Therapeutic miRNA and siRNA: moving from bench to clinic as next generation medicine. Molecular therapy-nucleic acids. 2017;8(1):132-43.

73. Acuña SM, Floeter-Winter LM, Muxel SM. MicroRNAs: biological regulators in pathogen-host interactions. Cells. 2020;9(1):1-13.

74. Lasjerdi Z, Ghanbarian H, Yeganeh SM, Tabaei SJS, Mohebbi M, Taghipour N. Comparative expression profile analysis of apoptosis-related miRNA and its target gene in *Leishmania major* infected macrophages. Iranian journal of parasitology. 2020;15(3):332-40.

75. Nunes S, Silva IB, Ampuero MR, Noronha ALLd, Souza LCLd, Correia TC. Integrated analysis reveals that miR-193b, miR-671, and TREM-1 correlate with a good response to

treatment of human localized cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Frontiers in immunology*. 2018;9:64–70.

76. Kevric I, Cappel MA, Keeling JH. New world and old world *Leishmania* infections : a practical review. *Dermatologic clinics*. 2015;33(3):579–93.

77. Santos DO, Coutinho CE, Madeira MF, Bottino CG, Vieira RT, Nascimento SB. Leishmaniasis treatment- a challenge that remains: a review. *Parasitology research*. 2008;103(1):1–10.

78. Awasthi A, Mathur RK, Saha B. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian journal of medical research*. 2004;11(9):238–58.

79. Bogdan C, Röllinghoff M. The immune response to *Leishmania* : mechanisms of parasite control and evasion. *International journal for parasitology*. 1998;28(1):121–34.

80. Lodish HF, Zhou B, Liu G, Chen C-Z. Micromanagement of the immune system by microRNAs. *Nature Reviews Immunology*. 2008;8(2):120–30.

81. Mohammadi-Yeganeh S, Paryan M, Samiee SM, Soleimani M, Arefian E, Azadmanesh K, et al. Development of a robust, low cost stem-loop real-time quantification PCR technique for miRNA expression analysis. *Molecular biology reports*. 2013;40(5):3665–74.

82. Lemaire J, Mkannez G, Guerfali FZ, Gustin C, Attia H, Sghaier RM. MicroRNA expression profile in human macrophages in response to *Leishmania major* infection. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013;7(10):12–32.

83. Geraci NS, Tan JC, McDowell MA. Characterization of micro RNA expression profiles in *Leishmania*-infected human phagocytes. *Parasite immunology*. 2015;37(1):43–51.



بسمه تعالی

تاریخ: ۹۹/۴/۳۰

شماره: ۹۹۲۵۹۹

کد اخلاق:

صور تجلیسه دفاع از پایان نامه

دانشگاه علوم پزشکی کرمان

تحصیلات تکمیلی دانشگاه

جلسه دفاعیه پایان نامه تحصیلی آقای سید احمد سید آزاد دانشجوی رشته اتکل شناسی پزشکی تحت عنوان " بررسی و مقایسه میزان بیان ژن microRNA۲۱Mir در سل لاین ماکروفاژهای J774 آلوده به سویه های لیثمانیا تروپیکا پاسخ دهنده و غیر پاسخ دهنده به داروی گلوکانتیم " در ساعت ۱۴ روز یکشنبه مورخ ۹۹/۶/۳۰ حضور اعضای محترم هیات داوران متشکل از:

سمت	نام و نام خانوادگی	امضا
الف: استادان راهنما	سرکار خانم دکتر زهرا بابایی	
	جناب آقای دکتر علی افکار	
ب: استادان مشاور	جناب آقای دکتر ایرج شریفی	
	سرکار خانم دکتر تانیا دهش	
ج: عضو هیات داوران (داخلی)	جناب آقای دکتر ناصر ضیاء علی	
د: عضو هیات داوران (خارجی)	جناب آقای دکتر حسین حسینی نوه	
ه: نماینده تحصیلات تکمیلی	جناب آقای دکتر محمد ابراهیمی پور	

تشکیل گردید و ضمن ارزیابی به شرح پیوست با درجه عالی و نمره ۱۹۷ مورد تأیید قرار گرفت.

مهر و امضاء معاون آموزشی

